Mezenterik İskemi-Reperfüzyon Hasarının Önlenmesinde Allopürinol, Süperoksid Dismütaz ve Dimetil Sülfoksit'in Etkileri

M. Faik ÖZÇELİK, Vedat DURGUN, Salih PEKMEZCİ, Büge ÖZ, Ahat ANDİCAN

İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Genel Cerrahi Anabilim Dalı
İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Patolojik Anatomi Anabilim Dalı
İSTANBUL

Özçelik MF, Durgun V, Pekmezci S, Öz B, Andican A.: Mezenterik iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde allopürinol, süperoksid dismütaz ve dimetil sülfoksit'in etkileri. Kolon Rektum Hast Derg, 3: 10-13, 1993

Çalışmada mezenterik iskemi sonrası reperfüzyon sırasında oksijen metabolitleri tarafından oluşan doku hasarının önlenmesinde süperoksid dismütaz (SOD), dimetil sülfoksit (DMSO) ve allopürinol'ün sitoprotektif etkileri araştırılmıştır. Kontrol ve deney gruplarında 30 dakikalık mezenterik iskemi sonrasında reperfüzyon oluşturulmuştur. 48 saat sonra hayatta kalan sıçanlar sakrifiye edilerek batınları makroskopik değerlendirildikten sonra, sağlam ve nekrozlu barsak bölümleri histopatolojik olarak incelenmiştir. 48 saat içerisinde eksitus olan sıçanlarda aynı inceleme eksitus olduktan hemen sonra yapılmıştır. Gruplar arasında mortalite açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.05). Kontrol grubuna göre DMSO ve allopürinol uygulanan gruplarda reperfüzyon hasarının daha az olduğu bulunmuştur (t: 2.68, p<0.05). Reperfüzyon sırasında SOD uygulanan grupta kontrol grubuna göre lezyonların daha az oluştuğu tesbit edilmiş fakat aradaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (t: 2.40, p> 0.05). Sonuç olarak reperfüzyon sırasında uygulanan DMSO ve deneyden iki gün önce per oral olarak verilen allopürinolün doku hasarını önlemede yararlı oldukları ile reperfüzyon sırasında uygulanan SOD'ın etkisiz kaldığı tesbit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Mezenterik iskemi, reperfüzyon hasarı, allopürinol, dimetil sülfoksid, süperoksid dismütaz

Effects of allopurinol, superoxide dismutase and dimethyl sulfoxide on the prevention of mesenteric ischemia-reperfusion injury: experimental study on rats

The effects of the allopurinol, superoxyde dismutase (SOD) and dimethyl sulfoxide (DMSO) are investigated in the prevention of the tissue injuries produced by oxygen metobolytes which occured during reperfusion following ischemia. The reperfusion was achieved after 30 minutes of mesenteric ischemia in the both control and experimental rat groups. The survived rats after 48 hours were sarified and the abdomens were examined, tissue samples from normal and necrotic bowel segments were examined histopathologically. The dead rats were also examined immediately after their death in similar manner. No significant difference in the mortality rate was observed between the groups (p>0.05). The degrees of reperfusion injuries in DMSO or allopurionol trated group were in lower extents compared with degrees of injuries in the control group (t: 2.68, p<0.05). In the SOD treated group, the extent of tissue injury were lesser than the control group, but the difference was not found significant (t: 2.40, p> 0.05). The results indicated that the use of DMSO given in reperfusion period or allopurinol given two days before the experiment perorally helps to lessen, albeit the use of SOD given in reperfusion period does not help to lessen the extents of the tissue injuries, following the mesenteric ischemia-reperfusion process.

Key words: Mesenteric ischemia, reperfusion injury, allopurinol, dimethyl sulfoxide, superoxyde dismutase

Adres: Dr. Faik ÖZÇELİK, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İSTANBUL

Tromboembolizm ve kan akımı yavaşlamasına bağlı intestinal iskemi yaşlı popülasyonda önemli mortalite ve morbidite nedenidir[1].

İskeminin zararlı etkileri iskemi sırasında oluştuğu gibi, daha büyük hasarın iskemik dokunun reperfüzyonu sonrası geliştiği gösterilmiştir[2].

Reperfüzyon sonrası gelişen doku hasarından reaktif oksijen metobolitleri büyük oranda sorumlu tutulmaktadır. İskemik dokularda reperfüzyon ile oluşan oksijen radikallerince başlatılan lipid peroksidasyonu ve protein hasarı, hücre fonksiyonu bozulması ve nekrozuna sebep olmaktadır[3].

Çalışmada reperfüzyon sonrası oluşan reaktif oksijen metobolitlerinin oluşmasını önleyen (Allopurinol) ve oluşmuşları temizleyen (Süperoksid dismütaz (SOD) ve dimetil sülfoksid (DMSO) ajanların sitoprotektif etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma İ.Ü.C.T.F. Patoloji Anabilim Dalı Hayvan Laboratuarında gerçekleştirilmiştir. Histopatolojik tetkikler Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

Çalışmada 40 adet 200-230 gr. ağırlıklarında Sprague-Dawley sıçanları kullanılmıştır. Denekler

10'arlık gruplar halinde 4 gruba ayrılmıştır.

Deneklerde, intraperitoneal ketamine hidroklorid (40mg/kg) anestezisi altında median laporotomiyi takiben superior mezenterik arter aortadan çıkışta disseke edilerek atravmatik vasküler klamplar ile 30 dakika süreyle klampe edildi. Daha sonra ayrı bir insizyonla sağ femoral ven disseke edilerek 24 no. kanül ile kateterize edildi (allopurinol grubu hariç).

Klampların alınmasından sonra, Grup I (kontrol grubu) sıçanlara (n=10) 5 ml. serum fizyolojik 5 dk.'da, Grup II sıçanlara (n=10) 5 cc. serum fizyolojik içinde % 20'lik Dimetil sulfoksit (MERCK) 5 dk.'da, Grup III sıçanlara (n=10) 5 cc. serum fizyolojik içinde 15000 Ü/kg. Superoksid dismutaz (SIGMA) 5 dk'da infüze edilmiştir. Grup IV sıçanlara (n=10) preoperatif 2 gün gavaj ile Allopurinol (SIGMA) 50 mg/kg verilmiştir.

Çalışma sonunda 3/0 ipek ile insizyonlar kapatılmış, sıçanlar 10'arlık gruplar halinde kafeslere konularak ad libutum su ve standart laboratuar hayvan yemi ile beslenmeye alınmışlardır. 48 saat içerisinde eksitus olan sıçanlar ile, yaşayanların 48 saat sonunda aşırı eter anestezisi ile sakrifiye edilmelerinden sonra, nekropsileri yapılarak 2 gözlemci tarafından birbirinden habersiz batınları incelenerek serbest peritoneal sıvı, adhezyon, intestinal gangren, ileus ve intraabdominal kanama olup olmadığı araştırılmıştır.

Araştırılan bulgular varolanlar için 1 olmayan için 0 puan verilerek kodlanmıştır. Elde edilen sonuçlar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile istatistiki olarak değerlendirilmiştir. Deneklerden normal ve gangrenli istestinal bölümlerden örnekler alınarak histopatolojik tetkikler yapılmıştır. Denek gruplarındaki mortalite ki kare testine göre istatistiki olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular

İlk 24 saat sonunda Grup I'de 4, Grup II'de 1, Grup III ve Grup IV'te 2 şer adet sıçan eksitus olmuştur. Bunların nekropsileri yapılarak batın içi gözden geçirilmiş ve histopatolojik tetkik için materyel alınmıştır. 48 saat sonunda bütün sıçanların sakrifiye edilmelerini takiben yapılan makroskopik ve mikroskopik tetkiklerinde: Grup I'deki sıçanların 8'inde adhezyon, 6'sında epitel hasarı ve mukazoda nekroz, 4'ünde ileus, 1'inde intraperitoneal kanama ve hepsinde intraperitoneal sıvı olduğu gözlendi.

Grup II'de (DMSO) ise 4 sıçanda intraperitoneal sıvı, 2'şer sıçanda adhezyon ve epitel hasarı ile mukozada nekroz, 1'er sıçanda da ileus ve intraperitoneal kanama bulunmuştur.

Grup III'de (SOD) 4 sıçanda intraperitoneal sıvı, 3 sıçanda epitel hasarı ile mukozada nekroz, 2'şer sıçanda ileus ve adhezyon, 1'inde de intraperitoneal kanama tesbit edilmiştir.

Grup IV'te (allopürinol) 3'er sıçanda epitel hasarı ile mukozada nekroz ve intraperitoneal sıvı varlığı, 2'şer sıçanda da ileus ve intraperitoneal adhezyon varlığı saptanmıştır.

Grupların değerlendirme skorları ve istatistiki sonuçlar Tablo I'de görülmektedir.

Tablo 1: Grupların değerlendirme skorları ve istatistiki olarak kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılması

	Değerlendirme skoru	P değeri (kontrol grubu ile kıyaslama)
Grup I (serum fizyolojik)	2.90 ± 1.29	
Grup II (DMSO)	1.00 ± 1.63	< 0.05
Grup III (SOD)	1.20 ± 1.75	> 0.05
Grup IV (Allopurinol)	1.000 ± 1.63	< 0.05

p< 0.05: anlamlı
p> 0.05: anlamsız

Grupların, istatistiki olarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılan karşılaştırmalarında kontrol grubuna göre DMSO ve Allopurionol ile elde edilen sonuçlar arasında anlamlı fark bulunmuştur (t: 2.68, p< 0.05). Kontrol grubu ile SOD verilen grup arasında anlamlı fark bulunmamıştır (t: 2.40, p> 0.05).

Mortalite oranının ki kare testine göre değerlendirilmesinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı p> 0.05 ($x^2 = 1.29$).

İrdeleme

Günümüzde tanı ve tedavisindeki ilerlemelere rağmen, mezenterik iskemi yaşlı popülasyonda önemli mortalite ve morbidite nedenidir[1].

İskemik dokularda kan akımının yeniden oluşturulması enerji sağlanması, toksik metabolitlerin temizlenmesi ve hücrenin ölümden kurtarılması için gereklidir. İskemik dokularda reperfüzyonun paradoksal olarak doku hasarı oluşturduğu gösterilmiştir[5]. Parks ve Granger reperfüzyon ile oluşan hasarın iskemi ile ortaya çıkan hasardan daha fazla olduğunu saptamışlardır[2].

Korthuis ve ark. ile Perry ve ark. iskemik dokularda anoksik reperfüzyonun çok az bir hasara neden olduğunu, reperfüzyon ile oluşan reoksijenasyondaki reaksiyonların moleküler oksijenden türeyen sitotok-

sik oksidanlara bağlı olduğunu bildirmişlerdir[6,7].

İskemi sonrası reperfüzyon hasarı kısa süreli iskemilerden sonra oluşmaktadır. İskemi süresi uzadıkça oksijensizliğe bağlı gelişen doku hasarı ortaya çıkmaktadır. Uzamış mezenterik iskemilerde reperfüzyonun doku canlılığına olan etkisi önemini yitirmektedir.

Sıçanlarda 1.30 ve 90 dakikalık süperior mezenterik arter oklüzyonlarının eşit mortalite oranları oluşturdukları Sawchuk ve ark. ile Grosfeld ve ark. tarafından bildirilmiştir[8,9].

İskemi sonrası reperfüzyon hasarından reaktif oksijen metabolitleri sorumludur. Oksijen radikalleri oluşması sonucunda dokulardaki bütün biomoleküllerde hasar gelişir (nükleik asitler, membran lipidleri, enzimler ve reseptörlerde). Membran lipidlerinin peroksidasyonu hücre lizisine yol açar. Reperfüzyon sonrasında oksijen radikallerine bağlı oluşan lipid peroksidasyonu ile protein hasarı hücrelerde fonksiyon bozukluğu ve nekroza kadar varan hasarlara neden olmaktadır[4,5].

Reperfüzyon sonrasında 2 ile 5 dakikalar içerisinde oksidanların oluştuğu saptanmıştır[5]. Lipid peroksidasyonun indeksi olarak kullanılan malondialdehit düzeyleri ölçümleri sonucunda, Otamiri ve Tagesson sıçanlarda 5 dakikalık reperfüzyon sonrasında mukozal ve plazma malondialdehit düzeylerinin 3 ile 4 misli arttığını bildirmişlerdir[10,11].

Deneysel çalışmalarda oksijen radikallerini temizleyici olarak süperoksid dismütaz, katalaz gibi enzimler ile nonenzimatik temizleyici olan dimetil sülfoksit, dimetil thioüre ve mannitol gibi ajanlar kullanılmıştır[5].

Barsaklarda oksijen radikali oluşturan bir enzim olan ksantin oksidazın bol miktarda bulunması intestinal reperfüzyon hasarlarında ksantin oksidazın etkisinin araştırılmasına neden olmuştur[12,13].

Çalışmamızda enzimatik oksijen radikali temizleyicisi olarak, reperfüzyon sırasında süperoksid dismütaz uyguladığımız grupta, serum fizyolojik uyguladığımız kontrol grubuna göre makroskopik, histopatolojik bulgular ve mortalite açısından reperfüzyon hasarının daha az olduğu gözlenmişsede bu sonuçlar istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır ($p> 0.05$). Granger ve ark, Parks ve ark. ile Schoenberg ve ark. reperfüzyon öncesi süperoksid dismütaz uygulamasının mukozal villüs ve kript epiteli nekrozunu da hafifletici etkisi olduğunu bildirmişlerdir[14,15,16].

Nonenzimatik oksijen radikali temizleyicisi olarak kullandığımız dimetil sülfoksitin reperfüzyon öncesi süperoksid dismütaz sırasında uygulanması ile kontrol grubuna göre reperfüzyon hasarını önleyici etkisi olduğu gözlenmiştir. İki grup arasında makroskopik ve histopatolojik bulgular açısından anlamlı fark olduğu bulunmuştur ($p< 0.05$). Mortalite açısından iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p> 0.05$). Dimetil sülfoksitin reperfüzyona bağlı doku hasarını azalttığı ile ilgili bulgularımız Demetriou ve ark. ile Parks ve ark. tarafından elde edilen sonuçlar ile uyum göstermektedir[12,17].

Ksantin oksidaz inhibitörü olarak allopürinol kullandığımız grupta, kontrol grubuna göre makroskopik, histopatolojik olarak reperfüzyon hasarının anlamlı olarak azaldığını tesbit ettik ($p< 0.05$). Bulgularımız Granger ve ark. Parks ve ark. tarafından elde edilen sonuçlar ile uyum göstermektedir[12,18]. İki grup arasında mortalite açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p> 0.05$).

Sonuç olarak istestinal iskemi sonrası reperfüzyona bağlı olarak gelişen hücre hasarının oluşmasının önlenmesinde dimetil sülfoksit ve allopurinolün yararlı etkileri olduğu ile reperfüzyon sırasında uygulanan süperoksit dismütazın etkisiz olduğu tesbit edilmiştir. Çalışmada kullanılan her üç maddenin mortalite açısından yararlı etkileri bulunmamıştır.

Kaynaklar

1. Kaleya RN, Sammartano RJ, Boley SJ.: Aggressive approach to acute mesenteric ischemia. Surg Clin North Amer, 72: 157, 1992
2. Parks DA, Granger DN.: Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. Am J Physiol, 250: 749, 1985
3. McCord JM.: Oxygen-drived free radicals in post ischemic tissue injury. New Engl J Med, 312 (3): 159, 1985
4. Weisiger Ra.: Oxygen radicals an ischemic tissue injury. Gastroenterolog, 90: 157, 1992
5. Zimmerman BJ, Granger Nd.: Reperfusion injury. Surg Clin of Nort Amer, 72: 157, 1992
6. Korthuis RJ, Smith JK, Carden DL.: Hypoxic reperfusion attenuates postischemic microvascular injury. Am J Physiol, 256: H315, 1989
7. Perry MA, Wadwa SS.: Gradual reintroduction of oxygen reduces reperfusion injury in cat stomach. Am J Physiol, 254: G366, 1988
8. Sawchuk A, Canal D, Slaughter M, Bearman D, O'Connor T, Grosfeld JL.: A comparison between fructose 1-6 diphosphate, glucose, or normal salive infusions and species-specific blood exchange transfusions in the treatment of bowel ischemia. Surgery, 100: 665, 1986
9. Grosfeld JI, Gross K, Cikrit D, Ross D, Wolfe M, Katz S, Weber TR.: Comperative effects of indomethacin, prostaglandin EI, and ibuprofen on bowel ischemia. J Pediatr Surg, 18:

738, 1983

10. Otamiri T, Tagesson C.: Ginkgo biloba extract prevents mucosal damage associated with small-intestinal ischemia. Scand J Gastroenterol, 24 : 666, 1989

11. Otamiri T.: Influence of quinacrine on plasma malondialdehyde after small istestinal ischemia and reperfusion. Cric Shock, 24: 63, 1988

12. Parks DA, Granger DN.: Ischemia-induced vascular changes: Role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. Am J Physiol, 245: G285, 1983

13. Granger DN.: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol, 255: H1269, 1988

14. Parks DA, Bulkley GB, Grager DN.: Ischemic injury in the cat small intestine: Role of superoxide radicals. Gastroenterology, 82: 9, 1982

15. Granger DN, Rutili G, McCord JM.: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. Gastroenterololgy, 81: 22, 1981

16. Schoenberg MH, Muhl E, Younes M.: Posthypotensive generation of superoxide free radicals: Possible role in the pathogenes is of the intestinal mucosal damage. Acta Chir Scand, 150: 301, 1984

17. Demetriou AA, Kagoma Pk, Kaiser S, Seifter E, Niu XT, Levenson SM.: Effect of dimethyl sulfoxide and glycerol on acute bowel ischemia in the rat. Am J Surg, 149: 91, 1985

18. Granger DN, McCord JM, Parks DA.: Wanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. Gastroenterology, 90: 80, 1986